

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

MIKROFLUOROMETRIE DIVALENTER KATIONEN AN MEMBRANEN IN SITU

Einfluß des Steroidhormons 20-OH-Ecdyson auf
membrangebundenes Calcium (Magnesium) in isolierten
Speicheldrüsen (*Chironomus thummi*)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Stefan Menzel aus Berlin

1976



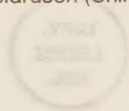
Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

MIKROFLUOROMETRIE DIVALENTER KATIONEN AN MEMBRANEN IN SITU

Einfluß des Steroidhormons 20-OH-Ecdyson auf
membrangebundenes Calcium (Magnesium) in isolierten
Speicheldrüsen (*Chironomus thummi*)



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Bestandteil der Dissertation der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

promoviert am 7.9.1976

vorgelegt von Stefan Menzel aus Berlin

Referent: Privatdozent Dr. Claus Behn

Korreferent: Professor Dr. Dr. Hans Kröger



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

promoviert am 7.9.1976

Mein Dank gilt dem Direktor des Instituts für Klinische Physiologie, Herrn Prof. Dr. med. K. Hierholzer, an dessen Institut ich die Experimente dieser Arbeit durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. med. M. Wiederholt danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Herrn Privatdozent Dr. med. C. Behn möchte ich für die Überlassung des Themas danken. Er hat das Entstehen der vorliegenden Arbeit wesentlich gefördert, mich in naturwissenschaftliche Arbeitsmethodik eingeführt und stand mir in vielen wertvollen Gesprächen beratend zur Seite. Dafür bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet.

Fräulein A. Lübbemeier danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
A) EINLEITUNG	5
B) METHODIK	8
1) Versuchstiere	8
a) Herkunft	8
b) Aufzucht	8
2) Präparation	10
a) Handhabung der Larve	10
b) Isolierung der Drüse	11
3) Inkubation	12
4) Versuchsaufbau	13
a) Perfusionskammer	13
b) Mikrofluorometrie	16
5) Versuchsablauf	18
6) Statistische Berechnungen	18
C) ERGEBNISSE	20
1) Zelluläre Chlortetracyclinfluoreszenz	20
2) Einfluß von Calcium und Magnesium im Perfusat auf die zelluläre Chlortetracyclinfluoreszenz	22

	<u>Seite</u>
3) Einfluß der Vorbehandlung (Inkubation I) auf die Fluoreszenzabnahme bei konstantem Calcium-Magnesium-Angebot (5- und 7 ml)	25
a) Kontrollen	25
b) Cumarin	25
c) Phytohaemagglutinin	25
d) 20-OH-Ecdyson	26
e) EDTA	26
f) Phytohaemagglutinin und 20-OH-Ecdyson	26
g) Abbildungen	27
D) DISKUSSION	31
1) Zur Methodik	31
a) Versuchsobjekt	31
b) Versuchstiere	32
c) Mikrofluorometrie	32
d) Calcium- (Magnesium-) Chlortetra- cyclinfluoreszenz	33
2) Zu den Ergebnissen	38
E) ZUSAMMENFASSUNG	46
F) LITERATUR	49

A) Einleitung

Steroide sind an den meisten biologischen Vorgängen beteiligt. Ihrem ubiquitären Vorkommen entspricht eine weite Verwendung in der Medizin. Wesentliche Aspekte ihres Wirkungsmechanismus sind noch unbekannt.

Als Hormone wirken viele Steroide auf die Proteinbiosynthese (1, 2, 3, 4, 5). Clever und Karlson haben an Dipterenlarven (*Chironomus tentans*) gezeigt, daß das Steroidhormon Ecdyson an bestimmten Chromosomenabschnitten eine starke Entspiralisierung und Auftreibung induziert (6). Solche "Puffs" sind Orte einer gesteigerten Genaktivität, wie am erhöhten Einbau markierter RNS-Vorstufen erkennbar (7). Die Ausbildung bestimmter Puffs war der Ecdysondosis proportional (6).

Karlson nimmt an, daß das Ecdyson direkt auf den Gen-Regulationsapparat wirkt (8, 9). Ob die Wirkung der Steroide direkt oder aber indirekt erfolgt, und wo der Ansatzpunkt des letztlich wirksamen Faktors innerhalb des allgemeingültigen Schemas der Proteinbiosynthese liegt, ist bisher nicht geklärt.

Für eine direkte Wirkung des Steroids auf den Genapparat spricht, daß auch isolierte Zellkerne auf Steroidapplikation mit einer erhöhten RNS-Synthese reagieren (10). Es ist aber nicht bewiesen, ob dabei die für das jeweilige Hormon spezifische RNS gebildet wird. Auch unphysiologische Substanzen können an isolierten Zellkernen eine gesteigerte RNS-Syntheserate hervorrufen (11).

Es besteht auch die Möglichkeit, daß Steroide die Genaktivität indirekt beeinflussen. Eine Voraussetzung für die Steroidwirkung auf die Proteinbiosynthese könnten Veränderungen des Ionenmilieus in der Zelle darstellen. Durch schrittweisen Ersatz von Natrium durch Kalium im extrazellulären Medium erzielte Kroeger an isolierten Speicheldrüsen (*Chironomus thummi*) eine Puffreaktion, die der unter Ecdysonwirkung entsprach (12). Tatsächlich bewirkt 20-OH-Ecdyson eine wesentliche Änderung der Natrium- und Kaliumkonzentration im Zellkern isolierter Speicheldrüsen (13).

Obgleich damit nicht gesagt ist, daß die Steroidwirkung auf eine Veränderung des intranukleären Ionenmilieus zurückzuführen ist, müssen Änderungen des intrazellulären Elektrolytmediums bei Überlegungen zum Wirkungsmechanismus dieser Hormone berücksichtigt werden.

Als ionalem Mittler von Hormonwirkungen kommt Calcium im Zusammenhang mit c-AMP eine entscheidende Rolle zu (14). Aufgrund bisher festgestellter Änderungen des intranukleären Ionenmilieus (13) und der intrazellulären c-AMP-Konzentration unter dem Einfluß von 20-OH-Ecdyson (16, 17) ist zu erwarten, daß dieses Hormon auch den zellulären Calciumstoffwechsel beeinflusst.

Um die Beteiligung des Calciums an einem zellulären Prozeß zu untersuchen, muß berücksichtigt werden, daß sich dieses Ion in freiem (ionisiertem) wie auch gebundenem Zustand befindet, und daß Änderungen im Verhältnis dieser beiden Formen physiologische Konsequenzen haben können, ohne daß sich der Gesamtcalciumgehalt der Zelle zu verändern braucht (18). Aus diesem Grund erscheint es notwendig, beide Calciumfraktionen

an Zellen in situ bestimmen zu können. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob 20-OH-Ecdyson, eine wesentlich wirksamere Form des natürlich vorkommenden Häutungshormons Ecdyson (19), den membrangebundenen Anteil des zellulären Calciums beeinflusst.

Um Elektrolytveränderungen in situ unter Steroidhormonwirkung darstellen zu können, sollten intakte Zellen verwendet werden, die hormonspezifisch reagieren, und deren Größe direkte Messungen erlaubt. Das trifft auf die Speicheldrüsenzellen einiger Dipteren zu.

Zur Darstellung des Verhaltens membrangebundener divalenter Kationen unter dem Einfluß eines Steroidhormons wurde Chlortetracyclin (CTC) verwendet. Dieses Antibiotikum eignet sich als Indikator membrangebundenen Calciums, weil es mit Calcium (und Magnesium) Chelate bildet, die in Abhängigkeit von der Polarität des Mediums fluoreszieren: in wässriger Lösung nur schwach, in einer lipophilen Umgebung aber mit großer Intensität (20).

Es wurde eine Methode entwickelt, um in situ an isolierten Speicheldrüsen von *Chironomus thummi*-Larven die 20-OH-Ecdysonwirkung auf die calciumabhängige Fluoreszenz von intrazellulär lokalisiertem CTC darzustellen. Dieses Antibiotikum ist als Calcium- (Magnesium-) Indikator bisher nur an isolierten Organellen (21, 22), nicht jedoch an intakten Zellen verwendet worden.

B) Methodik

1) Versuchstiere

a) Herkunft: Es wurden Dipterenlarven der species *Chironomus thummi* verwendet, die einer zwölf Jahre alten Zucht aus dem Institut für Genetik der Universität des Saarlandes entstammten. Die Tiere wurden uns dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. H. Kroeger zur Verfügung gestellt.

b) Aufzucht: Gelege, die etwa 400 spiralförmig angeordnete Eier enthielten, wurden drei Tage in entchlortem Leitungswasser (Contra Chlorine, Tetra Werke, Melle) bei 27° inkubiert. Für jede neue Zucht wurden 16 - 20 Gelege, die nicht älter als zwölf Stunden waren, auf vier Petrischalen verteilt. Nach dieser Inkubation erfolgte die Überführung der geschlüpften Larven zur weiteren Aufzucht in einen Plastikkasten, dessen Aufbau in Abb. 1 dargestellt ist.

In dem Aufzuchtbehälter, der eine Größe von 34 x 23 x 9 cm hatte, befanden sich:

Entchlortes Leitungswasser, das, beginnend mit dem fünften Tag nach der Aussetzung der Larven, fünf Mal wöchentlich gewechselt wurde.

Nahrung: 300 ml grobes und mittelfeines Brennesselpulver im Verhältnis 2 : 1, 100 ml feines Brennesselpulver (D. Grosz u. S., Ebingen / Württ.) und vier Lagen ungebleichter Zellstoff (20 x 30 cm).

Eine Umwälzanlage, deren Anordnung aus Abb. 1 ersichtlich ist. Ein Schlauch führte ständig Druckluft zu, wodurch die Flüssigkeit gleichzeitig belüftet und durch Kiesmaterial (Aqualit, Dose Aquaristik, Bonn) filtriert wurde.

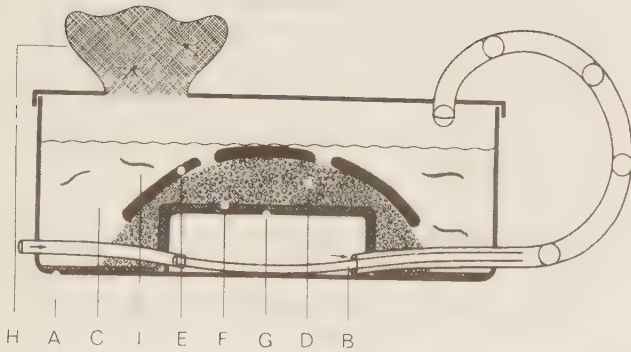


Abb. 1: Aufzuchtbehälter für Dipterenlarven (*Chironomus thummi*). A: Kunststoffgefäß, B: Schlauchsystem mit pressluftbetriebener Umwälzanlage, C: entchlortes Leitungswasser, D: Kiesgrund, E: Futter, F: Kunststoffgaze, G: Petrischale, H: Netzaufsatz mit Imagos, I: Larve.

Nach vier Wochen war die Entwicklung vom Ei über vier Larvenstadien, Vorpuppen- und Puppenstadium mit der Ausbildung zur Imago abgeschlossen. Die geschlüpften Tiere flogen in einen über dem Kasten angebrachten Netzaufsatz, in dem sie in einen Flugkäfig überführt wurden. Der mit Fliegengitter umspannte Flugkäfig hatte eine Größe von 90 x 45 x 100 cm.

Der Käfig wurde in zwölfstündlichem Rhythmus abwechselnd mit gelbem und rotem Licht bestrahlt. Eine auf dem Boden befindliche Plastikwanne wurde für zwölf Stunden mit entchlortem Leitungswasser gefüllt. Während dieser Zeit legten die Imagos ihre Gelege an den Rändern ab. Hier konnten sie mit einer Pinzette gesammelt und zur dreitägigen Inkubation in entchlortes Leitungswasser überführt werden.

Um eine kontinuierliche Versorgung mit Tieren eines definierten Alters zu gewährleisten, wurde zwei Mal wöchentlich ein neuer Aufzuchtbehälter angelegt.

2) Präparation

a) Handnaoung der Larve: Die Tiere konnten aus dem Plastikkasten mit Hilfe eines kleinen Siebes gefangen werden. Da die Larven sich jedoch meist im Futter aufhielten, wurde von diesem eine kleine Menge aus dem Aufzuchtbehälter entnommen und in entchlortes Leitungswasser gebracht. Hier erfolgte die Auswahl der zur Verwendung bestimmten Tiere. Diese waren 14 - 17 Tage alt und hatten die Merkmale des Larvenstadiums L4 Typ R nach Kroeger (23). Sie waren dunkelrot und 1,2 - 1,4 cm lang. Der Kopf hatte etwa den gleichen Durchmesser wie die nachfolgenden Thorakalsegmente. Das ausgesuchte Tier wurde zwei Mal mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde es in einem mit Calcium-Magnesium-freiem Medium (Tab. 1) gefüllten Uhrglas unter ein Stereomikroskop (Vergrößerung 16-fach) gebracht. Hier erfolgte die Präparation der Speicheldrüse.

b) Isolierung der Drüse: Die Larve wurde mit Uhrmacherpinzetten (A. Dumont u. fils, Schweiz) am Kopf und am Übergang vom proximalen zum mittleren Drittel des Körpers festgehalten (Abb. 2 a). Durch entgegengesetzten Zug wurde der Kopf vom Rumpf getrennt (Abb. 2 b). Mit der Pinzette wurden Drüsenausgang und Adhärenzen zwischen Drüse und Ösophagus durchtrennt (Abb. 2 c). Die nun frei im Medium schwimmende Drüse wurde in eine Haarschlinge aufgenommen (Abb. 2 d) und in einen Tropfen Calcium-Magnesium-freies Medium gebracht, der sich auf einem silikonisierten Deckplättchen befand (Abb. 2 e). Die Drüse haftete am Deckglas an und konnte so inkubiert werden (Abb. 3, 4).

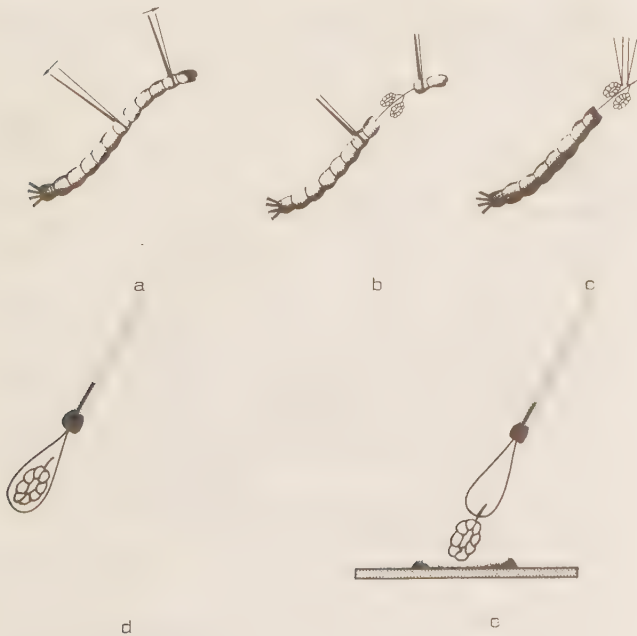


Abb. 2: Isolierung der Speicheldrüse. Präparation der Drüse (a - c) und atraumatische Überführung in einen Tropfen Calcium-Magnesium-freies Medium (d, e).

3) Inkubation

Die am Deckglas anhaftende Drüse befand sich, wie in Abb. 3 dargestellt, 60 Minuten in Elektrolytmedium (Tab. 1). Während dieses als Inkubation I bezeichneter Versuchsabschnittes wurden, je nach verwendetem Zusatz, unterschiedliche Bedingungen hergestellt (Tab. 2).

Zusätze des Inkubationsmediums waren:

- 20-OH-Ecdyson (Ecdysterone, Schwarz/Mann, Orangeburg, N.Y.)
- Phytohaemagglutinin (bacto-PHA-P, difco Labs., Detroit, Mich.)
- EDTA (Ca-Na₂-EDTA, Fluka 03630)
- Cumarin (3-(1-Phenyl-propyl)-4-hydroxy-cumarin als Marcumar, Hoffmann-La Roche AG)

Tabelle 1

Zusammensetzung des Elektrolytmediums (a) modifiziert nach Politoff

	mM		mM
KCl	2,00	NaCl	28,00
Na ₂ - Fumarat (b)	28,00	Glutamin (c)	22,00
Histidin (d)	22,00	TES (e)	5,00
Na ₂ - Succinat (f)	7,00	Na ₂ -Glycero- phosphat (g)	5,00
Citronensäure	0,25	NaOH	4,00 - 5,00 (h)

- a) Osmolarität: 230 m Osm/l
- b) Fumarsäure Dinatriumsalz (Merck-Schuchardt 820584)
- c) L(+)-Glutamin (Merck 239)
- d) L(-)-Histidin (Merck 4351)
- e) Tris-(hydroxy methyl) methyl-2-aminoäthan-sulfonsäure (Serva 37199)
- f) Succinat-Na₂-Salz (C. F. Boehringer ZS. 15147 SSAA)
- g) DL- α -Glycerinphosphorsäure. Na₂-Salz (Serva 23320)
- h) nach Bedarf für Einstellung pH 7,40

Tabelle 2

Zusätze zum Medium der Inkubation I

	20-OH- Ecdyson $4,1 \times 10^{-4} \text{ M}$	Phytohaem- agglutinin 0,5 $\mu\text{l/ml}$	EDTA $5 \times 10^{-4} \text{ M}$	Cumarin $2 \times 10^{-5} \text{ M}$
Versuchs- serie				
a	-	-	-	-
b	+	-	-	-
c	+	+	-	-
d	+	-	+	-
e	-	+	-	-
f	-	+	+	-
g	-	-	+	-
h	-	-	-	+

Nach dieser unterschiedlichen Vorbehandlung wurde das Präparat in eine Perfusionskammer eingebracht. Hier erfolgte die Inkubation II, bei der sich die Drüsen 20 Minuten in Calcium-Magnesium-freiem Medium (Tab. 1) mit CTC und EDTA befanden.

4) Versuchsaufbau

a) Perfusionskammer: Inkubation II (Abb. 4) und anschließende Mikrofluorometrie der Drüsen wurden in einer Perfusionskammer durchgeführt. Diese bestand aus der zentralen Aushöhlung (1,5 x 1,5 cm) eines Plexiglasobjektträgers (Abb. 5).

Das Deckglas mit der anhaftenden Drüse schloß die Kammer nach oben hin ab, so daß sich die Drüse in einem Tropfen des Mediums befand (Inkubation II). Der Tropfen befand sich auf einem Stutzen in der Mitte der Kammer. Das Deckglas wurde durch einen inneren Ring aus Silikonfett (PB, Wacker Chemie, München) und einen äußeren aus flüssigem Silikongummi (Elastosil 07, Wacker Chemie, München) am Objektträger fixiert. 20 Minuten später war das Silikongummi erhärtet, und die Kammer konnte ohne Verschiebung des Deckglases perfundiert werden. Die Perfusionsflüssigkeit wurde der Kammer aus einer Spritze über einen Schlauch zugeführt. Die Perfusionsrate betrug 9,5 ml/Stunde (Perfusor Braun, Melsungen). Ein zweiter Schlauch führte die Perfusionsflüssigkeit aus der Kammer.

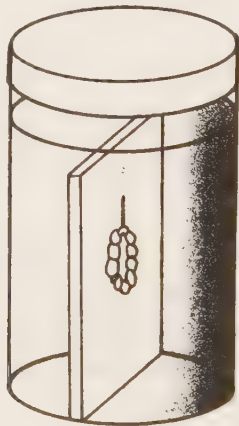


Abb. 3: Vorbehandlung der Drüse (Inkubation I). Die Drüse befand sich 60 Minuten in Elektrolytmedium (Tab. 1). Durch Zusatz eines oder mehrerer Wirkstoffe wurden unterschiedliche Versuchsbedingungen hergestellt (Tab. 2).



Abb. 4: Vorbehandlung der Drüse (Inkubation II).

Die Drüse befand sich 20 Minuten in einem Tropfen Elektrolytmedium, das CTC und EDTA enthielt. Der Silikonring ist auf beiden Seiten der Abbildung sichtbar. Das Deckglas schließt die Perfusionskammer nach oben hin ab.



Abb. 5: Objektträger mit Perfusionskammer (sagittaler Schnitt).

Die Perfusionskammer wird von der zentralen Aushöhlung des Objektträgers gebildet. Während der Inkubation II war die Drüse in einem Tropfen des Mediums, der sich auf dem Stutzen in der Mitte der Kammer befand.

b) Mikrofluorometrie: Die Perfusionskammer mit der isolierten Speicheldrüse befand sich auf dem Objektstisch eines Orthoplanmikroskops (Leitz, Wetzlar). Das Präparat war für Auf- und Durchlicht zugänglich. Bei Durchlicht (Niedervoltleuchte 12 V, 60 W) wurde die Drüse im Phasenkontrast (Heine Kondensor, Leitz) aufgesucht. Eine Zelle mit homogenem Cytoplasma und glatter Zellmembran wurde mit dem Objektiv 10/0,23 im Okularfadenkreuz (Periplan GF 12,5 x MF) zentriert. Anschließend wurde das Objektiv gewechselt (Fl. Obj. 95/1,32) und ein cytoplasmatischer Anteil so focussiert, daß der Zellrand scharf abgegrenzt erschien.

Der mikrofluorometrische Versuchsaufbau ist in Abb. 6 dargestellt:

Das Auflicht kam aus einer Hg-Höchstdrucklampe (1). In dem Lampenhaus 250 befanden sich zwei Filter BG 38 à 4 mm (2). Das Licht passierte eine Irisblende (3) und fiel auf einen Fotoverschluß (8). Ein Motor (10) öffnete den Fotoverschluß eine Sekunde/Minute, wobei die Abstände von einer Schaltuhr (9) vorgegeben waren. Das intermittierend durchgelassene Licht passierte den Erregerfilter (4), gelangte auf den dichroischen Spiegel (7) im Ploem'schen Auflichtilluminator und wurde dort durch das Objektiv auf das Präparat in der Perfusionskammer (13) gelenkt. Hier regte es eine $100 \mu\text{m}^2$ große Fläche im Cytoplasma einer Zelle zur Fluoreszenzstrahlung an. Das Fluoreszenzlicht, mit einer größeren Wellenlänge als das Erregerlicht, passierte den dichroischen Spiegel (7), die Sperrfilter (6, 14) und erreichte den Fotovervielfacher (15). Dieser wurde von einem Fotometer Eppendorf betrieben (16). Über eine Transformationsstufe (17) gelangte das Signal auf einen Kompensationsschreiber (Rikadenki) (18), so daß die angeregte Fluoreszenz linear registriert werden konnte.

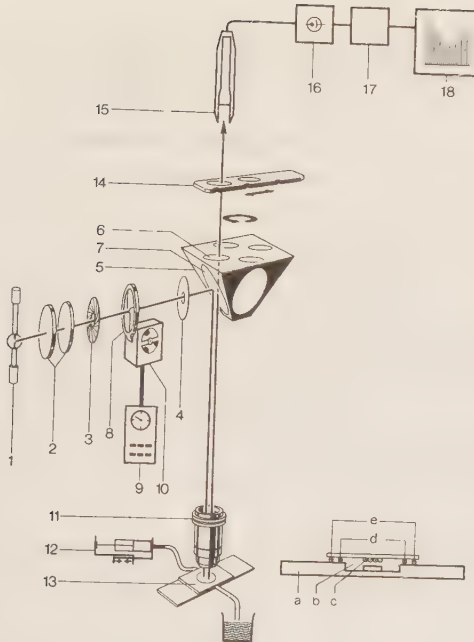


Abb. 6: Mikrofluorometrischer Versuchsaufbau. Hg-Höchstdrucklampe (1), Wärmeschutzfilter (2), Irisblende (3), Erregerfilter (4), Teilerspiegel (5, 6, 7), Fotoverschluss (8), Schaltuhr (9), Elektromotor (10), Objektiv (11), Perfusionspumpe (12), Perfusionskammer (13), Sperrfilter (14), Fotovervielfacher (15), Fotometer (16), Transformationsstufe (17), Registriergerät (18).

Zusätzlich war die Möglichkeit der Betrachtung im Durchlicht gegeben.

5) Versuchsablauf

Die intermittierend angeregte Fluoreszenz wurde unter wechselnden Perfusionsbedingungen registriert (Tab. 3).

Phase A: Die Perfusionsflüssigkeit entsprach in der Phase A (10 Min.) dem Medium der Inkubation II (20 Min.), so daß die Drüse insgesamt 30 Minuten der Calcium-Magnesium-freien Elektrolytlösung mit CTC und EDTA ausgesetzt war.

Phase B: Anschließend wurde 30 Minuten mit Calcium-Magnesium-haltigem Medium perfundiert. Die Konzentration an divalenten Kationen betrug 5 (Calcium) und 7 (Magnesium) mM. Der Einfluß der Konzentration divalenter Kationen auf die zelluläre CTC-Fluoreszenz wurde in einer gesonderten Versuchsreihe untersucht.

Phase C: Im letzten Versuchsabschnitt wurde wieder Calcium-Magnesium-frei perfundiert.

Der Versuchsablauf ist in Tab. 3 schematisch dargestellt.

6) Statistische Berechnungen

Mittelwerte wurden $\pm$ SEM dargestellt, und Differenzen auf ihre Signifikanz mit dem t-Test nach Student für ungepaarte Daten geprüft.

Tabelle 3

Zusammensetzung der Perfusionsmedien (a)

Perfusionsphase	A	B (b)	C
Minuten	10	30	20
Calcium (mM)	-	5,0 (c)	-
Magnesium (mM)	-	7,0 (c)	-
Chlortetracyclin (μ M)	5,0	5,0	5,0
EDTA (mM)	0,5	-	0,5

- a) Grundlage war das in Tab. 1 dargestellte Elektrolytmedium.
- b) Elektrolytmedium wie in Tab. 1, jedoch wurde Na_2 -Succinat durch Mg-Succinat ersetzt.
- c) Ausnahme s. Abb. 10

C) Ergebnisse

1) Zelluläre Chlortetracyclinfluoreszenz

Das mit der beschriebenen Versuchsanordnung erfaßte Meßfeld innerhalb des Cytoplasmas einer Speicheldrüsenzelle ist in Abb. 7 dargestellt. Die mit Auflicht ausgeleuchtete Fläche beträgt etwa $100 \mu\text{m}^2$.

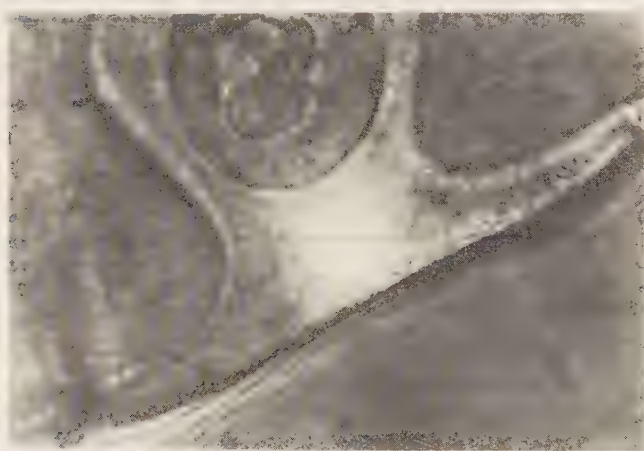


Abb. 7: Punktförmige Anregung der zellulären CTC-Fluoreszenz im Cytoplasma einer Speicheldrüsenzelle (Chironomus) in vitro (Vergrößerung 400 x).

In Abb. 8 sind intermittierende und kontinuierliche Form der Anregung gegenübergestellt: bei intermittierender Anregung war eine Zunahme der zellulären CTC-Fluoreszenz festzustellen, ein Zeichen der Aufnahme des Farbstoffes in die Zelle. Wurde die Fluoreszenz dagegen kontinuierlich angeregt, nahm sie schnell ab (fading). Weder das Medium noch die Zelle wiesen eine registrierbare Eigenfluoreszenz auf.

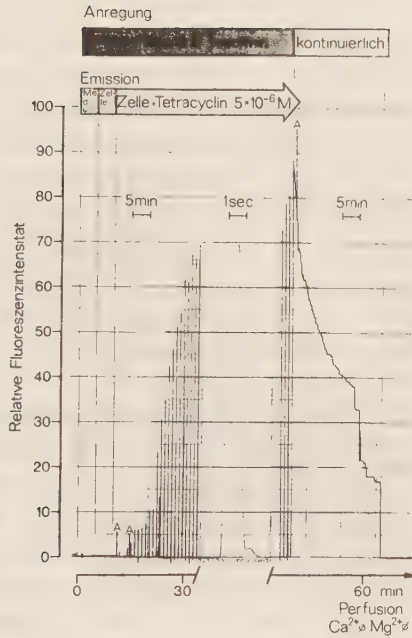


Abb. 8: Fluoreszenzanregung im Cytoplasma isolierter Speicheldrüsenzellen. Bei intermittierender Fluoreszenzanregung wurde die Aufnahme von CTC in die Zelle als zunehmende zelluläre CTC-Fluoreszenz sichtbar, während bei kontinuierlicher Anregung die Emission trotz fortgesetzten CTC-Angebots abnahm. Medium und Zelle zeigten keine registrierbare Eigenfluoreszenz.

2) Einfluß von Calcium und Magnesium im Perfusat auf die zelluläre Chlortetracyclinfluoreszenz

Das Ausgangsniveau der zellulären CTC-Fluoreszenz (= 100 % Fluoreszenzintensität) wurde in Calcium-Magnesium-freiem Medium erreicht. In Abwesenheit extrazellulärer divalenter Kationen (Perfusionsphase A und C, Tab. 3) war eine Zunahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten, wie auch zu Beginn der Perfusionsphase B (Abb. 9). Nach zehnminütiger Perfusion mit Calcium-Magnesium-haltigem Medium begann die Fluoreszenzintensität abzunehmen. Diese Zeit benötigte die Perfusionsflüssigkeit, um aus dem Perfusor über ein Schlauchsystem in die Perfusionskammer zu gelangen.

Die Abhängigkeit der zellulären CTC-Fluoreszenz von der Konzentration divalenter Kationen in der Perfusionsflüssigkeit ist in Abb. 10 dargestellt. Eine Verdoppelung der üblicherweise verwendeten Konzentration (Tab. 3) beschleunigte die Abnahme der Fluoreszenz. Wurde die Standardkonzentration an Calcium und Magnesium um die Hälfte vermindert, trat eine Verzögerung der Fluoreszenzabnahme auf. Bei weiterer Reduktion des Calcium-Magnesium-Angebotes war die Abnahme der Fluoreszenz weitgehend aufgehoben.

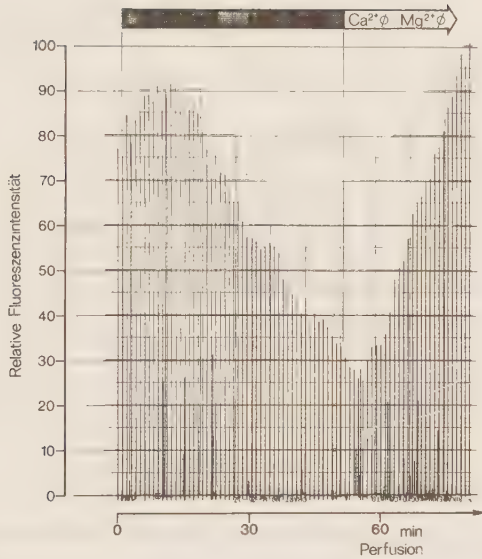


Abb. 9: Einfluß divalenter Kationen im Perfusat auf die zelluläre CTC-Fluoreszenz. Divalente Kationen verminderten die relative Fluoreszenzintensität, in Abwesenheit von Calcium und Magnesium nahm die relative Fluoreszenzintensität zu.

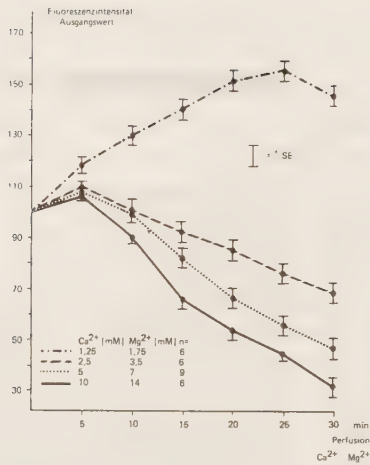


Abb. 10: Abhängigkeit der zellulären CTC-Fluoreszenz von der Konzentration divalenter Kationen im Perfusat. Bei zunehmender Calcium-Magnesium-Konzentration im Medium war die Abnahme der zellulären CTC-Fluoreszenz verstärkt.

3) Einfluß der Vorbehandlung (Inkubation I) auf die Fluoreszenzabnahme bei konstantem Calcium-Magnesium-Angebot (5- und 7 mM)

a) Kontrollen:

Präparate, bei denen die Inkubation I ohne Zusatz eines Wirkstoffes durchgeführt wurde, zeigten den gleichen Verlauf der Fluoreszenzintensität wie in Abb. 9 dargestellt. Sie unterschieden sich nicht von den Drüsen, die unmittelbar nach der Präparation, also ohne vorherige Inkubation, untersucht wurden (nicht dargestellte Ergebnisse). Die Kontrollen erreichten nach 30-minütiger Perfusion mit Calcium-Magnesium-haltigem Medium eine Fluoreszenzintensität, die 62 % des Ausgangswertes betrug (Abb. 11).

b) Cumarin:

Die Vorbehandlung (Inkubation I) mit Cumarin beschleunigte die Abnahme der zellulären CTC-Fluoreszenz. Nach 30-minütiger Calcium-Magnesium-Perfusion war die Fluoreszenzintensität mit 36 % des Ausgangswertes signifikant geringer als bei Kontrollen (Abb. 11).

c) Phytohaemagglutinin (bacto-PHA-P):

Nach Vorbehandlung mit bacto-PHA-P war die Fluoreszenzabnahme gegenüber den Kontrollwerten erheblich verzögert. Nach 30-minütiger Perfusion mit Calcium-Magnesium-haltigem Medium war die Fluoreszenzintensität nahezu identisch mit der Ausgangsintensität, und mit 95 % signifikant höher als bei Drüsen, die ohne Wirkstoff inkubiert wurden (Abb. 12).

d) 20-OH-Ecdyson:

Bei Vorbehandlung (Inkubation I) der Drüse mit dem Steroidhormon zeigte die Fluoreszenzabnahme bei Calcium-Magnesium-haltigem Perfusat einen bacto-PHA-P-ähnlichen Effekt, wenn auch in geringerem Ausmaß. Mit 02 % war jedoch der 30-Minutenwert signifikant höher als der Kontrollwert (Abb. 11).

e) EDTA:

Bei Vorbehandlung der Drüse mit diesem Calciumkomplexbildner war die Abnahme der zellulären CTC-Fluoreszenz beschleunigt. Die Fluoreszenzintensität war nach 30 Minuten mit 46 % vom Ausgangswert signifikant geringer als bei Kontrollen (Abb. 12). EDTA hob sowohl den verzögernden Effekt des 20-OH-Ecdyson als auch des bacto-PHA-P auf die Fluoreszenzabnahme auf. Gegenüber der Inkubation mit dem Hormon allein war die Fluoreszenzabnahme bei Vorbehandlung mit Hormon und EDTA gleichzeitig mit 48 % des Ausgangswertes signifikant verstärkt (Abb. 13). EDTA verminderte auch den bacto-PHA-P-Effekt. Die Fluoreszenzintensität mit 54 % nach 30 Minuten entsprach nahezu den Kontrollwerten. Sie war somit gegenüber solchen Drüsen, deren Inkubation I nur mit bacto-PHA-P durchgeführt wurde, signifikant vermindert (Abb. 12).

f) Phytohaemagglutinin (bacto-PHA-P) und 20-OH-Ecdyson:

Wurden der Drüse während der Inkubation I gleichzeitig bacto-PHA-P und 20-OH-Ecdyson zugeführt, kam es zu einer Aufhebung der bei getrennter Verwendung der Substanzen aufgetretenen Effekte (Abb. 14).

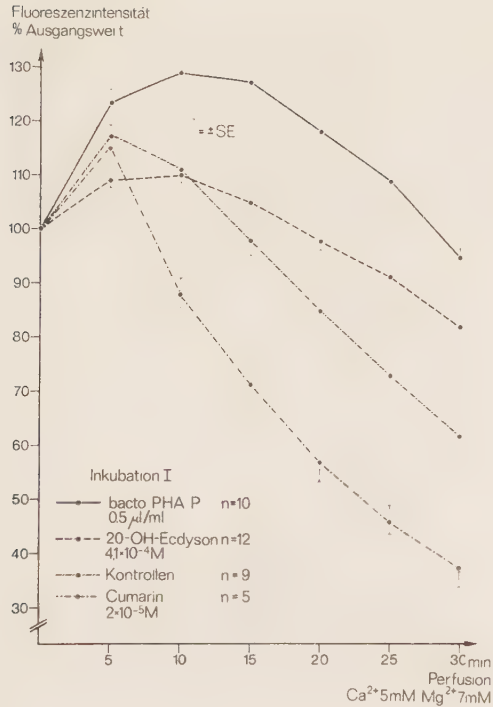


Abb. 11: Einfluß der Vorbehandlung (Inkubation I) auf das Fluoreszenzverhalten im Cytoplasma isolierter Speicheldrüsen bei Zugabe divalenter Kationen zum Perfusat. Die Inkubation wurde mit bacto-PHA-P, 20-OH-Ecdyson, Cumarin und ohne Wirkstoff (=Kontrollen) durchgeführt. Bacto-PHA-P und 20-OH-Ecdyson verzögerten, Cumarin beschleunigte die Abnahme der Fluoreszenzintensität gegenüber Kontrollen.

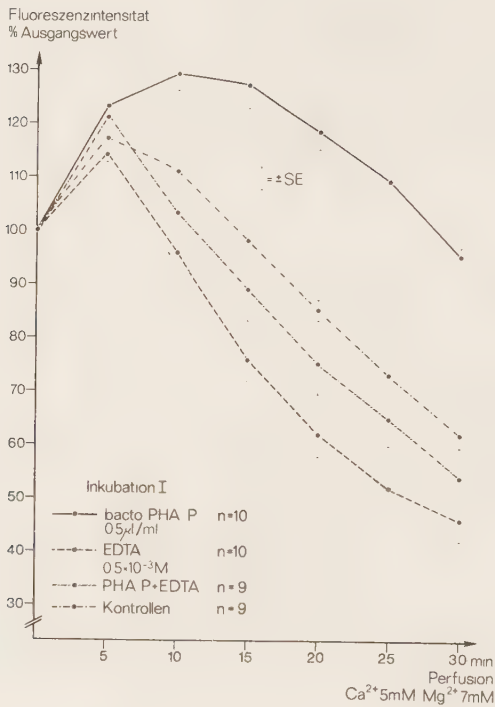


Abb. 12: Einfluß der Vorbehandlung (Inkubation I) auf das Fluoreszenzverhalten im Cytoplasma isolierter Speicheldrüsen bei Zugabe divalenter Kationen zum Perfusat. Die Inkubation wurde mit bacto-PHA-P, EDTA, beiden Substanzen gleichzeitig und ohne Wirkstoff (=Kontrollen) durchgeführt. Bacto-PHA-P verzögerte, EDTA beschleunigte die Fluoreszenzabnahme gegenüber Kontrollen. EDTA hob den verzögernden Effekt des bacto-PHA-P auf die Fluoreszenzabnahme auf.

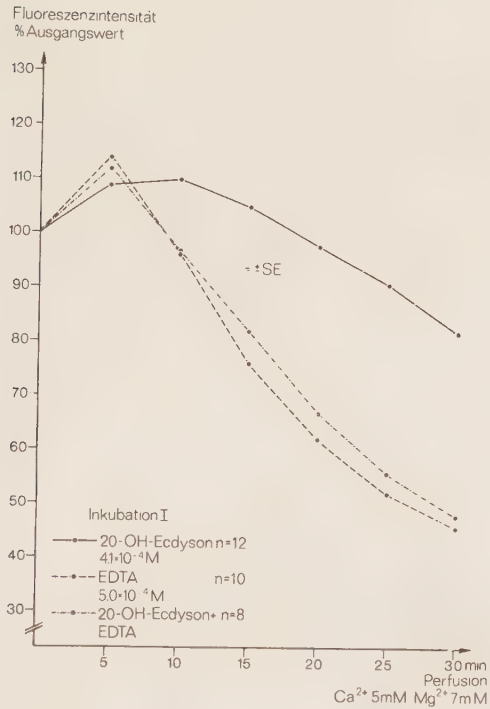


Abb. 13: Einfluß der Vorbehandlung (Inkubation I) auf das Fluoreszenzverhalten im Cytoplasma isolierter Speicheldrüsen bei Zugabe divalenter Kationen zum Perfusat. Die Inkubation wurde mit 20-OH-Ecdyson, EDTA und beiden Wirkstoffen gleichzeitig durchgeführt. Der Steroidhormoneffekt war bei gemeinsamer Inkubation mit EDTA aufgehoben.

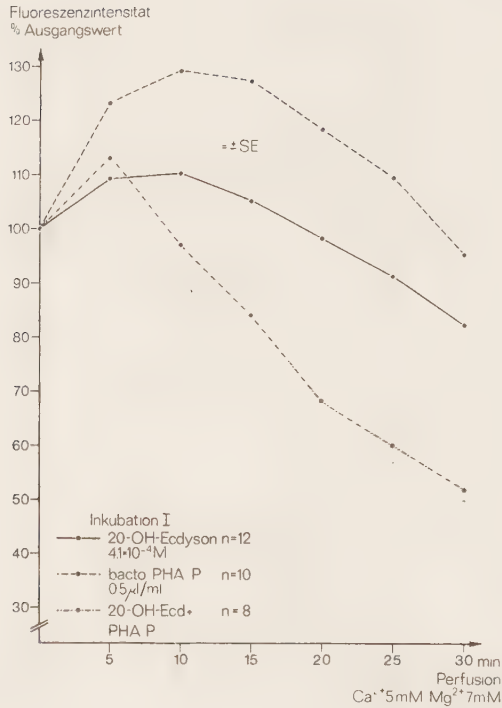


Abb. 14: Einfluß der Vorbehandlung (Inkubation I) auf das Fluoreszenzverhalten im Cytoplasma isolierter Speicheldrüsen bei Zugabe divalenter Kationen zum Perfusat. Die Inkubation wurde mit 20-OH-Ecdyson, bacto-PHA-P und beiden Wirkstoffen gleichzeitig durchgeführt. Waren 20-OH-Ecdyson und bacto-PHA-P gemeinsam im Inkubationsmedium enthalten, kam es zu einer Aufhebung der jeweiligen Einzeleffekte.

D) Diskussion

1) Zur Methodik

a) Versuchsobjekt: Die Untersuchung der Steroidwirkung auf subzelluläre Ionenverhältnisse in situ erfordert Zellen, deren Größe direkte Messungen in definierten Bereichen erlaubt, und deren Reaktion auf das verwendete Steroidhormon spezifisch ist. Beide Bedingungen werden von Speicheldrüsenzellen einiger Dipteren (Chironomus, Drosophila) erfüllt. Der Aufbau der Drüse ist in Abb. 15 dargestellt. Die Speicheldrüsen enthalten polyploide Zellen mit großem Kern- und Zellvolumen, so daß mit dem Erregerlicht definierte Zellbereiche erfaßt werden konnten (Abb. 7).

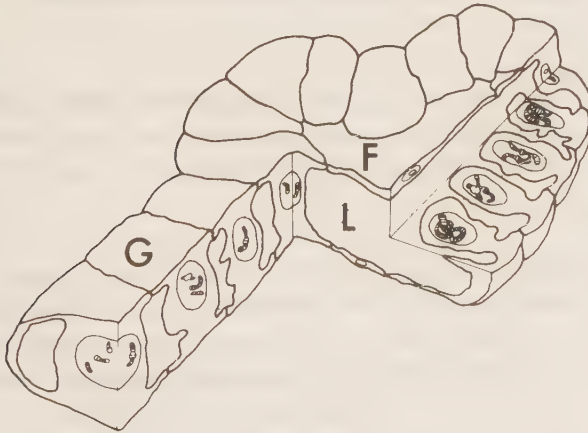


Abb. 15: Schematische Darstellung einer Speicheldrüse (Chironomus thummi) nach Rose (25). Um das Lumen (L) sind etwa 30 Riesenzellen (G) angeordnet, deren Durchmesser 100 - 150 μ m beträgt. Außerdem wird das Lumen von flachen F-Zellen umspannt.

b) Versuchstiere: Die morphologischen Merkmale der verwendeten Dipterenlarven (*Chironomus thummi*) weisen eine hohe Variabilität auf. Zur Standardisierung wurden die Tiere nach Kriterien ausgesucht, die den Larventyp L4 R nach Kroeger charakterisieren (23).

c) Mikrofluorometrie: Fluoreszenzmessungen in situ müssen den zellschädigenden Einfluß des Erregerlichtes und die Empfindlichkeit des Fluorochroms unter der Bestrahlung berücksichtigen.

Das Erregerlicht mußte daher optimal genutzt werden: Mit Hilfe eines Fotoverschlusses wurde nur kurzfristig (eine Sekunde) und intermittierend (1 x/Minute) bestrahlt. Eine Irisblende zentrierte das Erregerlicht auf eine Fläche von etwa $100 \mu\text{m}^2$ in der Objektebene.

Eine kontinuierliche Bestrahlung des Objekts führte zu einer schnellen Abnahme der Fluoreszenz. Bei intermittierender Anregung hingegen wurde die Aufnahme des Fluorochroms als Zunahme der zellulären Fluoreszenzintensität sichtbar (Abb. 8).

Das Präparat war für Auf- und Durchlicht zugänglich. Die Drüse wurde im Durchlicht mit Glühlampenbeleuchtung untersucht. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte im Auflicht. Dabei ist die Strahlenführung zentriert, weil das Objektiv auch die Funktion eines Kondensors übernimmt. Die Fluoreszenzintensität ist besonders hoch, weil weniger Lichtverluste durch Streuung oder Eigenabsorption als bei Durchlicht entstehen.

Die Fluoreszenzintensität ist von der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs abhängig. Deswegen werden zur Auflichtanregung Mikroskopobjektive möglichst hoher numerischer Apertur benutzt. Das ist möglich, wenn große Tiefenschärfen unnötig sind, wie im Fall der vorliegenden Anordnung der Zelloberfläche in einer Ebene an der Unterscite des Deckglases.

Die Ölimmersion führt neben der Erhöhung der Brechzahl und damit der numerischen Apertur auch dazu, daß Reflexe zwischen Deckglas und Frontlinse und Brechungen an Glas/Luftflächen vermieden werden.

Zur Registrierung einer möglichst calciumspezifischen Fluoreszenz wurde ein Sperrfilter verwendet (530 nm), entsprechend dem Maximum des Fluoreszenzspektrums von Calcium-Chlortetracyclinkomplexen in apolarem Medium (26).

d) Calcium-(Magnesium-)Chlortetracyclinfluoreszenz:

Zur Darstellung des Verhaltens membrangebundener divalenter Kationen eignet sich Chlortetracyclin (CTC) aus folgenden Gründen:

CTC bildet mit Calcium und Magnesium Chelate, die in Abhängigkeit von der Polarität des Mediums fluoreszieren. In wässriger Lösung ist die Fluoreszenz nur gering, in einer lipophilen Umgebung aber sehr intensiv (20).

Die Stabilität des Komplexes ist nicht sehr groß, so daß der Indikator der jeweils höheren Konzentration divalenter Kationen folgen kann (21).

CTC penetriert Membranen. Es läßt sich eine Kumulation des Antibiotikums in den Mitochondrien lebender Zellen nachweisen (27).

Calcium und Magnesium zeigen mit CTC in wässriger Lösung ähnliche, in apolarer Umgebung mit 530 und 520 nm jedoch unterschiedlich gelagerte Emissions- und Erregungsmaxima (26).

In der Zelle liegt Calcium zum großen Teil membrangebunden vor (18). Membranen bestehen zum großen Teil aus Lipiden. Es ist daher anzunehmen, daß die Fluoreszenzintensität der Konzentration membrangebundenen Calciums entspricht.

Caswell und Hutchison verwendeten CTC zur Darstellung divalenter Kationen an isolierten Membranen (22). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit Hilfe des Antibiotikums Aufschluß über den Calciumstoffwechsel an intakten Zellen zu erhalten. Während dieser Untersuchungen erschien eine Veröffentlichung von Täljedal, der mit der CTC-Fluoreszenz die Rolle des zellulären Calciums in Zusammenhang mit der Insulinsekretion an lebenden β -Zellen des Mäusepankreas untersuchte (28). Dabei wurde festgestellt, daß in $10 \mu\text{M}$ CTC-Lösung inkubierte β -Zellen mit einem Emissionsmaximum von 530 nm fluoreszieren, entsprechend dem Maximum der Calcium-CTC-Fluoreszenz in apolarem Medium (26).

Aufgrund der hohen Dissoziationsrate des Chelatkomplexes und der geringen Permeabilität der Zellmembran für Calcium und Magnesium ist anzunehmen, daß die Aufnahme des Fluorochroms in die Zelle von dem extrazellulären Angebot an divalenten Kationen abhängig ist. Das bedeutet, daß eine hohe extrazelluläre Konzentration divalenter Kationen den

Einstrom des Antibiotikums in die Zelle verhindern kann. Westphal und Winckler fanden dementsprechend, daß CTC als Indikator zellulären Calciums ungeeignet ist, wenn es intravital verwendet wird (29).

Um die Aufnahme des CTC in intakte Zellen zu ermöglichen, wurde das Antibiotikum während der Vorbehandlung (Inkubation I und II) in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium und Magnesium angeboten. Der Indikator konnte in diesem Fall, den intrazellulären divalenten Kationen folgend, in die Zelle gelangen. Die Aufsättigung der Zelle mit dem Antibiotikum war an der Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Calcium-Magnesium-freiem Perfusionsmedium zu erkennen. In der Perfusionsphase B dagegen (Calcium 5 mM, Magnesium 7 mM) nahm die zelluläre Fluoreszenzintensität ab, entsprechend der nun extrazellulär erhöhten Konzentration divalenter Kationen (Abb. 9).

Die Fluoreszenzabnahme bei Calcium-Magnesium-haltigem Perfusat (Phase B) ist auf eine Verlagerung des Indikators in den Extrazellulärraum zurückzuführen. Abb. 10 zeigt, daß die zelluläre CTC-Fluoreszenz von der extrazellulären Konzentration divalenter Kationen abhängig ist.

Unterschiede in der Anklingquote der Fluoreszenz bei gegebener extrazellulärer Konzentration divalenter Kationen sind demnach Ausdruck von Änderungen der Konzentration membran-gebundenen Calciums (Magnesiums).

Es erhebt sich die Frage, welche Membranen mit der Mikrofluorometrie in den Zellen erfaßt wurden. Das Antibiotikum wird von Mitochondrien lebender Zellen akkumuliert (27). Die Membranoberfläche der Mitochondrien übertrifft die der Zellmembran um den Faktor 30 (18). Diese Hinweise lassen vermuten, daß mit der angegebenen Technik vorwiegend mitochondriale Membranen erfaßt wurden. Zur Prüfung dieser Annahme wurden die Drüsen während der Inkubation I so vorbehandelt, daß Änderungen der Calcium- (Magnesium-) Konzentration in den Mitochondrien zu erwarten waren. Nach Borlo (30) ist die mitochondriale Calcium- (Magnesium-) Konzentration (Ca_m) von folgenden Faktoren abhängig:

- cytoplasmatische Calciumkonzentration (Ca_c)
- Ratenkonstante des Calciumeinstroms vom Cytoplasma in Mitochondrien (k_{cm})
- Ratenkonstante des Calciumausstroms aus Mitochondrien ins Cytoplasma (k_{mc})

$$Ca_m = Ca_c \frac{k_{cm}}{k_{mc}}$$

Die cytoplasmatische Calciumkonzentration ist wiederum abhängig von den Flüssen des Ions durch die Zellmembran. Unter diesen Voraussetzungen haben wir zunächst eine Versuchsserie mit Phytohemagglutinin (Phase-I) durchgeführt. Dieses pflanzliche Glykoprotein führt an Lymphozyten zu einer Calciumaufnahme, und dabei zu deren Transformation (30, 31, 32). Die Abb. 11, 12 und 14 zeigen, daß die Vorbehandlung (Inkubation I) der Speicheldrüse mit dem Agglutinin zu einer gegenüber Kontrollen verzögerten Fluoreszenzabnahme bei Erhöhung divalenter Kationen im Perfusionsmedium (Phase B) führte. Der Wirkstoff läßt offensichtlich den Konzentrations-

gradienten an Calcium (Magnesium) zwischen Medium und Mitochondrien abnehmen. Der Indikatorausstrom aus der Zelle war damit entsprechend verringert.

Eine gegenüber Kontrollen beschleunigte Fluoreszenzabnahme trat ein, wenn die Inkubation I mit Äthylendiaminotetraacetat (EDTA) durchgeführt wurde. Dieser Wirkstoff sequestriert Calcium, ohne selber in die Zelle zu gelangen. Der Calciumeinstrom in die Zelle und in mitochondriale Membranen war daher vermindert. In der Perfusionsphase B war dementsprechend der Konzentrationsgradient an divalenten Kationen zwischen Medium und Mitochondrien erhöht, es resultierte ein beschleunigter Indikatorausstrom aus der Zelle (Abb. 12, 13).

Die Vorbehandlung der Drüse mit Cumarin, einem spezifischen Hemmstoff der mitochondrialen Calciumaufnahme (18, 33), führte in der Perfusionsphase B zu einer gegenüber Kontrollen beschleunigten Fluoreszenzabnahme (Abb. 11). Die zelluläre CTC-Fluoreszenz verhielt sich entsprechend einem verminderten Calciumeinstrom in die Organellen. Der erhöhte Konzentrationsgradient an divalenten Kationen zwischen Medium und Mitochondrien beschleunigte die Fluoreszenzabnahme bei Calcium-Magnesium-haltigem Perfusat (Abb. 11).

Damit schienen Voraussetzungen gegeben, die Abklingquote der Fluoreszenz chlortetracyclinbeladener Zellen bei Erhöhung der extrazellulären Calcium- (Magnesium-) Konzentration (Phase B) als Parameter für die Konzentration divalenter Kationen mitochondrialer Membranen in situ zu verwenden.

2) Zu den Ergebnissen

Aus der Diskussion der Methode geht hervor, daß mit der zellulären CTC-Fluoreszenz membrangebundenes Calcium (Magnesium) dargestellt werden konnte:

1. Die Drüsen wurden in Abwesenheit divalenter Kationen mit CTC inkubiert, wobei die Fluoreszenz in Abhängigkeit der anschließend angebotenen Calcium- (Magnesium-) Konzentration im Perfusat abnahm (Abb. 10).
2. CTC bildet mit Calcium (Magnesium) fluoreszierende Komplexe, deren Intensität von der Konzentrationsdifferenz divalenter Kationen zwischen Membran und Medium abhängig ist (s. Diskussion der Methodik).
3. Die Vorbehandlung (Inkubation I) mit verschiedenen Substanzen (Tab. 2) veränderte das Fluoreszenzverhalten entsprechend dem Einfluß des verwendeten Wirkstoffes auf den zellulären Calciumstoffwechsel (Abb. 11, 12, 13, 14).

Die Ergebnisse zeigen, daß das Steroidhormon 20-OH-Ecdyson die Konzentration divalenter Kationen mitochondrialer Membranen offensichtlich vermindert.

Die Abnahme der zellulären CTC-Fluoreszenz bei einer gegebenen Erhöhung der extrazellulären Calcium- (Magnesium-) Konzentration (Perfusionsphase B) wurde nach unterschiedlicher Vorbehandlung (Tab. 2) untersucht. Die Inkubation I mit dem Steroidhormon 20-OH-Ecdyson ($4,1 \times 10^{-4}$ M) führte bei Calcium-Magnesium-Perfusion zu einer gegenüber Kontrollen verzögerten Abnahme der zellulären CTC-Fluoreszenz (Abb. 11). Dieses

Verhalten ähnelt dem bereits diskutierten Effekt des bacto-PHA-P. Die verzögerte Fluoreszenzabnahme ist vermutlich durch eine Verminderung der Konzentrationsdifferenz divalenter Kationen zwischen Membranen und extrazellulärem Medium bedingt.

Da die Zusammensetzung des Perfusats die gleiche wie unter Kontrollbedingungen war, ist anzunehmen, daß die verzögerte Fluoreszenzabnahme bei Vorbehandlung mit dem Steroidhormon durch eine Zunahme der membrangebundenen Calciumkonzentration zustandekommt. Der Steroid- wie auch der bacto-PHA-P-Effekt auf die Abklingquote der zellulären CTC-Fluoreszenz können durch einen vermehrten Einstrom von Calcium in die Zelle, und einer dadurch erhöhten Calciumaufnahme in die Mitochondrien bedingt sein.

Der Effekt des Steroids wie auch der des bacto-PHA-P war aufgehoben, wenn die Drüse zusätzlich zu den genannten Wirkstoffen mit EDTA vorbehandelt wurde (Abb. 12, 13). Da EDTA den Calciumeinstrom in die Zelle verhindert, müßte das unter Steroid- und bacto-PHA-P-Einwirkung vermehrt erscheinende membrangebundene Calcium extrazellulären Ursprungs sein.

Mit einem verstärkten Calciumeinstrom in die Zelle ist eine Zunahme der Konzentration freier Calciumionen im Cytoplasma, und damit eine Erhöhung des Calciumangebotes an die Mitochondrien verbunden.

Der Befund, daß die Inkubation I mit 20-OH-Ecdyson und bacto-PHA-P gleichzeitig die jeweiligen Effekte auf die Fluoreszenzabnahme aufhob (Abb. 14), spricht für einen ähnlichen Wirkungsort beider Substanzen.

Änderungen der zellulären Calciumkonzentration haben in mehrfacher Hinsicht eine funktionelle Bedeutung. Calcium ist am Wirkungsmechanismus verschiedener Steroidhormone beteiligt.

Eine Steroidbehandlung (Vitamin D, Cortison) führt bei verschiedenen Tierspecies zu einer Veränderung des Calciumtransports und der zellulären Calciumhomöostase. Die dominierende Rolle der Mitochondrien im zellulären Calciumstoffwechsel zeigt sich beim Einfluß von Steroiden auf den transzellulären Calciumtransport am Darm. Vitamin D steigert die intestinale Calciumresorption dadurch, daß es neben der Calciumaufnahme in die Zelle, und damit in die Mitochondrien, auch die Abgabe dieses Ions aus den Mitochondrien stimuliert (34). Die Folge ist eine erhöhte cytoplasmatische Calciumaktivität. Das führt zu einem erhöhten Angebot an die Calciumpumpe, die auf der serosalen Seite der Darmzellen das Ion aus dem Cytosol in das Blut befördert.

Der Vitamin D-Effekt ist durch Cortison hemmbar (35). Nach Kimberg (36) bewirkt Cortison an Rattenlebermitochondrien eine Vergrößerung dieser Organellen. Dieser Effekt kommt vermutlich dadurch zustande, daß neben der Calciumaufnahme in die Mitochondrien auch die Abgabe dieses Ions aus den Mitochondrien vermindert

wird. Die Abnahme der intestinalen Calciumresorption durch Cortison (35) könnte demnach die Folge der verminderten cytoplasmatischen Calciumaktivität, und damit des verminderten Angebots an die Calciumpumpe sein.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde lassen vermuten, daß auch 20-OH-Ecdyson den zellulären, insbesondere den mitochondrialen Calciumstoffwechsel beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen, daß membrangebundenes Calcium in der Zelle nach Vorbehandlung mit 20-OH-Ecdyson vermehrt vorliegt. Da intrazelluläres membrangebundenes Calcium vorwiegend in den Mitochondrien lokalisiert ist, ist anzunehmen, daß 20-OH-Ecdyson die Calciumaufnahme in diese Organellen erhöht. Der Effekt des Steroids auf die mitochondriale Calciumaufnahme ist durch EDTA hemmbar. Es wird gefolgert, daß 20-OH-Ecdyson die Calciumaufnahme in die Mitochondrien durch ein erhöhtes Angebot von Calcium aus dem Extrazellulärraum über eine vergrößerte Calciumpermeabilität der Zellmembran bewirkt.

Änderungen des c-AMP-Systems durch Steroide (16, 17) sprechen auch für eine Beteiligung der zellulären Calciumhomöostase am Wirkungsmechanismus dieser Hormone. Die Rolle des Calciums im c-AMP-System (37) ist in Abb. 16 dargestellt.

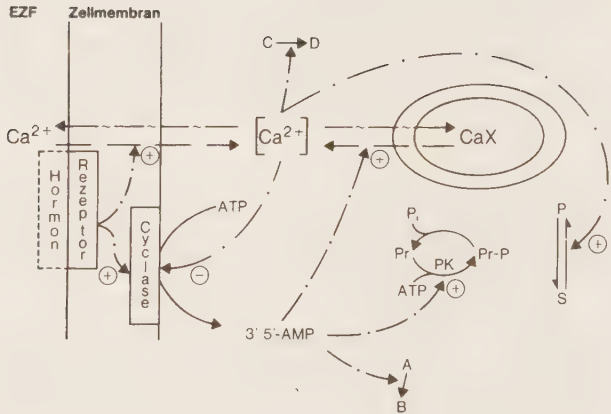


Abb. 16: Schematische Darstellung eines allgemeinen zellulären Steuerungssystems mit c-AMP und Calciumionen als Hauptbestandteile(nach Rasmussen)

Pr und Pr-P: Dephospho- und Phosphoprotein.

PK: Proteinkinase.

CaX: Mitochondriales Calcium.

P und S: Produkt und Substrat für eine Reaktion, die durch Calciumionen ein positives Steuerungssignal erhält.

C → D: Eine Reaktion, die durch Calciumionen gesteuert wird.

Die Pfeile stellen passive (—→) oder aktive (—~→) Transportprozesse dar.

Die unterbrochenen Pfeile (—-→) bedeuten Steuerungssignale, entweder negative (⊖) oder positive (⊕).

Die ausgezogenen Pfeile (—→) symbolisieren enzymatische Reaktionen.

Die Reaktion des Hormons mit seinem Rezeptor an der Zellmembran löst zwei Vorgänge aus:

1. Die Adenylcyclase wird aktiviert, so daß aus ATP c-AMP entsteht. Die erhöhte intrazelluläre c-AMP-Konzentration beeinflusst die Phosphorylierung, und damit die Funktion verschiedener Enzyme über eine Aktivierung von Proteinkinasen. Außerdem stimuliert c-AMP die Freisetzung von Calcium aus den Mitochondrien.
2. Die Membranpermeabilität für Calcium wird erhöht, und damit der Einstrom des Ions in die Zelle vergrößert. Die erhöhte Calciumaktivität im Cytosol ist ein auslösender Faktor für Strukturänderungen von Makromolekülen, und somit von Enzym- und auch Genaktivitäten. Letztlich erfolgt durch die erhöhte Calciumaktivität auch eine Hemmung der Adenylcyclase, und damit eine negative Rückkoppelung des Regelkreises.

Mehrere Befunde sprechen für eine Beteiligung des c-AMP-Systems am Wirkungsmechanismus von Steroiden. Am Rattenuterus führte eine Behandlung mit c-AMP zu Effekten, die denen einer Östrogenapplikation entsprechen (15). An isolierten Speicheldrüsen von *Drosophila hydei* wurde gefunden, daß das c-AMP-System den spezifischen Effekt des 20-OH-Ecdysons auf die Genaktivität potenziert. Darüber hinaus wurde beobachtet, daß mit dem Hormon inkubierte Speicheldrüsen 200 % mehr c-AMP enthielten als Kontrollen (16). Ein weiterer Hinweis dafür, daß 20-OH-Ecdyson das System des c-AMP beeinflusst, ist der Befund, daß das Hormon die calciumabhängige Adenylcyclase in einem Flügelhautpräparat stimulierte (17).

Da c-AMP in Verbindung mit Calcium wirkt (14), sprechen die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Änderungen des Calciumstoffwechsels unter dem Einfluß von 20-OH-Ecdyson ebenfalls für eine Beteiligung des c-AMP-Systems am Wirkungsmechanismus dieses Hormons. Die Tatsache, daß 20-OH-Ecdyson über eine Stimulation der Adenylcyclase zur vermehrten Bildung von c-AMP führt spricht dafür, daß auch der erhöhte Calciumeinstrom in die Zelle durch dieses c-AMP zustande kommt. Die Permeabilität der Zellmembran für Calcium wird durch c-AMP erhöht (14). Dementsprechend setzt c-AMP auch Calcium aus mitochondrialen Membranen frei (37). Trotz dieser vermehrten Freisetzung von Calcium aus den Mitochondrien resultiert letztlich eine Zunahme membrangebundenen Calciums in Mitochondrien, da diesen gleichzeitig über die Permeabilitätszunahme der Zellmembran vermehrt Calcium angeboten wird.

Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration beeinflussen auch den Kaliumgehalt der Zelle. Injektionen von Calciumionen in Neuronen erhöhten die Kaliumleitfähigkeit der Membran (39, 40). An Erythrocyten ist in Verbindung mit einem erhöhten Calciumeinstrom eine Zunahme der Permeabilität für Kalium beobachtet worden (41, 42). Die Kaliumpermeabilität von künstlichen Lipidmembranen ist davon abhängig, daß Calcium auf beiden Seiten der Membran in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegt (43).

Es besteht daher die Möglichkeit, daß auch steroidbedingte Änderungen der Kaliumpermeabilität auf eine veränderte intrazelluläre Calciumkonzentration zurückzuführen sind. Vorausgegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, daß unter dem Einfluß des 20-OH-Ecdysons

die Kaliumkonzentration im Zellkern abnahm (13). Dieser Hormoneffekt ist möglicherweise auf eine erhöhte Kalium-permeabilität der Zellmembran zurückzuführen. Elektrophysiologische Untersuchungen an der Rattenniere zeigten, daß Aldosteron an der luminalen Tubulusemembran eine Zunahme der relativen Kaliumpermeabilität bewirkte, die im Gegensatz zur antinatriuretischen Wirkung durch einen Hemmstoff der Transkription (Aktinomycin D) nicht beeinflussbar war (44).

Schließlich ist auch die positiv inotrope Wirkung des Aldosterons möglicherweise der Ausdruck eines Steroideinflusses auf den zellulären Calciumstoffwechsel (45).

Die bei 20-OH-Ecdyson nachgewiesenen Wirkungen auf die Genaktivität, das c-AMP-System und den intranukleären Ionenhaushalt können mit den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Änderungen des zellulären Calciumstoffwechsels in kausalem Zusammenhang stehen.

E) Zusammenfassung

- 1) Mikrofluorometrische Untersuchungen wurden an Speicheldrüsenzellen von Dipterenlarven der species *Chironomus thummi* Kieffer durchgeführt, um festzustellen, ob, und gegebenenfalls wie, das Steroidhormon 20-OH-Ecdyson den zellulären Calciumstoffwechsel beeinflusst.
- 2) Für den Nachweis von membrangebundenem Calcium wurde das Antibiotikum Chlortetracyclin verwendet, das mit divalenten Kationen fluoreszierende Komplexe bildet. Diese erstmals an lebenden Zellen durchgeführte Calciumbestimmung geht auf eine Methode zurück, die von Caswell an isolierten Membranen angewendet wurde.
- 3) Mit 5 μ M Chlortetracyclin in Calcium-Magnesium-freiem Medium inkubierte Zellen (30 Min.) zeigten eine intensive Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 530 nm (Emission), die dem Fluoreszenzmaximum des Calcium-Chlortetracyclin-komplexes in apolarem Medium entspricht.
- 4) Die Intensität der zellulären Chlortetracyclinfluoreszenz war abhängig von der Konzentration divalenten Kationen im Medium. Eine Erhöhung der Konzentration extrazellulären Calciums und Magnesiums verringerte die zelluläre Chlortetracyclinfluoreszenz.

- 5) Die Fluoreszenzabnahme war bei gegebener extrazellulärer Calcium-Magnesium-Konzentration von der Vorbehandlung der Zellen abhängig.

Unter Kontrollbedingungen führte die Perfusion mit Calcium (5 mM) und Magnesium (2 mM) zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität auf 62 % des Ausgangswertes. Der entsprechende Wert nach Vorbehandlung mit Phytohaemagglutinin betrug 95 %.

Im Gegensatz zu diesem verzögernden Effekt auf die Abnahme der zellulären Chlortetracyclinfluoreszenz hatte Cumarin einen beschleunigenden Einfluß (36 % des Ausgangswertes).

Da die beiden letztgenannten Substanzen die mitochondriale Calciumaufnahme jeweils stimulieren und hemmen, ist die Abnahme der zellulären Chlortetracyclinfluoreszenz bei gegebenem extrazellulären Calcium-Magnesium-Angebot ein Parameter für die Calciumkonzentration in mitochondrialen Membranen in situ.

- 6) Das Steroidhormon 20-OH-Ecdyson verzögerte, ähnlich wie Phytohaemagglutinin, die Abnahme der zellulären Chlortetracyclinfluoreszenz bei gegebenem extrazellulären Calcium-Magnesium-Angebot (82 % des Ausgangswertes).

Der Phytohaemagglutinin- wie auch der 20-OH-Ecdyson-Effekt wurden durch extrazelluläres EDTA aufgehoben.

- 7) Es wird gefolgert, daß das Steroidhormon 20-OH-Ecdyson einen Anstieg der mitochondrialen Calciumkonzentration über eine Zunahme des Calciumeinstroms in die Zelle bewirkt. Die Beteiligung von Calcium am Wirkungsmechanismus von 20-OH-Ecdyson kann Genaktivitäten, das c-AMP-System und die Permeabilität der Zellmembran für Kalium betreffen.

F) Literatur

1. GELEHARTER, T. D. (1973) Mechanisms of hormonal induction of enzymes. Metabolism 22, 85 - 100.
2. HECHTER, O., HALKERSTON, I. D. K. (1965) Effects of steroid hormones on gene regulation and cell metabolism. Ann. Rev. Physiol. 27, 133 - 162.
3. WICKS, W., KENNEY, F. T. (1969) RNA-synthesis in rat seminal vesicles: stimulation by testosterone. Science 144, 1346.
4. WICKS, W., GREENMAN, D. L., KENNEY, F. T. (1969) Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones. J. Biol. Chem. 240, 4414.
5. HAMILTON, T. H. (1968) Control by estrogen of genetic transcription and translation. Science 161, 649.
6. CLEVER, U., KARLSON, P. (1960) Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsen-Chromosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson. Exp. Cell. Res. 20, 623 - 626.
7. LEZZI, M. (1967) RNS- und Proteinsynthese in Puffs isolierter Speicheldrüsen-Chromosomen von *Chironomus*. Cromosoma (Bln.) 21, 72 - 88.

8. KARLSON, P., SEKERIS, C. E. (1973) Wirkungsmechanismus der Steroidhormone. Dtsch. Med. Wschr. 98, 831 - 835.
9. KARLSON, P. (1961) Biochemische Wirkungsweise der Hormone. Dtsch. Med. Wschr. 86, 668 - 674.
10. SEKERIS, C. E., DUKES, P. P., SCHMIDT, W. (1965) Wirkung von Ecdyson auf Epidermiszellkerne von Calliphora-Larven in vitro. Hope-Seiler's Z. Physiol. Chem. 341, 152 - 154.
11. DIAMANTSTEIN, T., ULMER, A. (1975) The control of immune response in vitro by Ca^{++} . II. The Ca^{++} -dependent thyroid during mitogenic stimulation. Immunology 28, 121 - 125.
12. KROEGER, H. (1963) Chemical nature of the system controlling gene activities in insect cells. Nature 200, 1234 - 1235.
13. BEHN, C., STÜBING, K., LÜBBEMEIER, A., WIEDERHOLT, M. (1973) Nuclear sodium and potassium concentration in steroid treated epithelial cells. Pflügers Arch. 343 (Suppl.) R, 62.
14. RASMUSSEN, H. (1970) Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphat. Science 170, 404 - 412.

15. VOKAER, A., IACOBELLO, G., KRAM, R. (1974) Phospho-protein phosphatase activity associated with estrogen-induced protein in rat uterus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, No 11, 4432 - 4436.
16. LEENDERS, H. J., WULLEMS, G. J., BERENDES, H. D. (1970) Competitive interaction of adenosine 3' - 5' - monophosphate on gene activation by ecdysterone. Exp. Cell. Res. 63, 159 - 164.
17. APPLEBAUM, S. W., GILBERT, L. I. (1973) Stimulation of adenylyl cyclase in pupal wing epidermis by β -ecdysone. Devel. Biol. 27, 165 - 175.
18. BORLE, A. B. (1973) Calcium metabolism at the cellular level. Fed. Proc. 32, 1944 - 1950.
19. CHIHARA, C. J., PETRI, W. H., FRISTROM, J. W., KING, D. S. (1972) The assay of ecdysones and juvenile hormones on *Drosophila* imaginal disk in vitro. J. Insect. Physiol. 18, 1115 - 1123.
20. CASWELL, A. H., HUTCHISON, J. D. (1971) Visualization of membrane bound cations by a fluorescent technique. Biochem. Biophys. Res. Com. 42, 43 - 49.
21. CASWELL, A. H. (1972) The migration of divalent cations in mitochondria visualized by a fluorescent chelate probe. J. Membrane Biol. 7, 345 - 364.

22. CASHWELL, A. H., WARREN, S. (1972) Observation of calcium uptake by isolated sarcoplasmatic reticulum employing a fluorescent chelate probe. Biochem. Biophys. Res. Com. 46, 1757 - 1763.
23. KROEGER, H. (1973) Zur Normalentwicklung von *Chironomus thummi* Kieffer. Allgemeine Morphologie, Speicheldrüsenentwicklung und puffing-Aktivität in Riesenchromosomen (Insecta, Diptera). Z. Morph. Tiere 74, 65 - 88.
24. POLITOFF, A. L., SOCOLAR, S. J., LOEWENSTEIN, W. R. (1969) Permeability of a cell membrane junction. Dependence on energy metabolism. J. Gen. Physiol. 53, 498 - 515.
25. ROSE, B. (1971) Intercellular communication and some structural aspects of membrane junctions in a simple cell system. J. Membrane Biol. 5, 1 - 19.
26. CASHWELL, A. H., HUTCHISON, J. D. (1971) Selectivity of cation chelation to tetracyclines: evidence for a special conformation of calcium chelate. Biochem. Biophys. Res. Com. 43, 625 - 630.
27. Du BUY, H. G., SHOWACRE, J. L. (1961) Selective localization of tetracycline in mitochondria of living cells. Science 133, 196 - 197.
28. TÄLJEDAL, J. (1974) Interaction of Na^+ and Mg^{++} with Ca^{++} in pancreatic islets as visualized by chlorotetracycline fluorescence. Biochem. Biophys. Acta. 372, 154 - 161.

29. WINCKLER, J., WESTPHAL, W. (1973) Zur Spezifität des Calciumnachweises durch Tetracyclin.
Histochemie 33, 95 - 105.
30. WHITNEY, R. B., SUTHERLAND, R. M. (1973) Characteristics of calcium accumulation by lymphocytes and alteration in the process induced by phytohaemagglutinin.
J. Cell. Physiol. 82, 9 - 20.
31. WHITNEY, R. B., SUTHERLAND, R. M. (1972) Requirement for calcium ions in lymphocyte transformation stimulated by phytohaemagglutinin.
J. Cell. Physiol. 80, 329 - 333.
32. WHITNEY, R. B., SUTHERLAND, R. M. (1972) Enhanced uptake of calcium by transforming lymphocytes.
Cell. Immunol. 5, 137 - 147.
33. BONLE, A. B. (1972) Kinetic analysis of calcium movements in cell culture. V. Intracellular calcium distribution in kidney cells.
J. Membrane Biol. 10, 63 - 66.
34. BONLE, A. B. (1974) Kinetic studies of calcium movements in intestinal cells: Effects of vitamin D deficiency and treatment.
J. Membrane Biol. 16, 207 - 220.
35. KIMBERG, D. V., DANIEL, V. (1969) Effects of vitamin D and steroid hormones on the active transport of calcium by the intestine.
New England J. of Med. 1396 - 1405.

36. KIMBERG, D. V., LOEB, J. N. (1972) Effects of cortisone administration in rat liver mitochondria.
J. of Cell Biol. 55, 635 - 643.
37. RASMUSSEN, H. (1974) Die hormonale Steuerung der Knochenzellfunktion. Triangel 12, Nr. 3, 103 - 110.
38. BORLE, A. B. (1974) Cyclic AMP stimulation of calcium efflux from kidney, liver and heart mitochondria. J. Membrane Biol. 16, 221 - 236.
39. MEECH, R. W. (1972) Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in Aplysia nerve cells.
Comp. Biochem. Physiol. 42A, 493 - 499.
40. FELTZ, A., KRNJEVIC, K., LISIWICZ, A. (1972) Intracellular free Ca^{++} and membrane properties of motoneurons. Nature New. Biol. 237, 179 - 181.
41. ROMERO, P. J., WHITTAM, R. (1971) The control by internal calcium of membrane permeability to sodium and potassium. J. Physiol. 214, 481 - 507.
42. DUNN, M. J. (1974) Red blood cell calcium and magnesium: effects upon sodium and potassium transport and cellular morphology.
Biochem. Biophys. Acta 352, 97 - 116.

43. PAPANADJOPOULOS, D., OHKI, S. (1969) Stability of asymmetric phospholipid membranes.
Science 164, 1075 - 1077.
44. WIEDERHOLT, M., SCHOORMANS, W., FISCHER, F., DEHN, C. (1973) Mechanism of action of aldosterone on potassium transfer in the rat kidney,
Pflügers Arch. 346, 159 - 178.
45. SAYERS, G., LEFER, A. M., NADZAM, G. R. (1966) Aldosterone and cardiac function.
Endocrinology 78, 211 - 213.

Lebenslauf

Ich wurde am 17. Juni 1948 als fünftes Kind des Oberstudienrats Martin Menzel und dessen Ehefrau Charlotte in Berlin geboren.

Von 1954 bis 1957 besuchte ich die Ruppin-Grundschule. Danach wechselte ich auf das Rheingau-Gymnasium, wo ich 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich mit dem Medizinstudium an der Freien Universität Berlin. Nach Vorphysikum (1970) und Physikum (1972) arbeitete ich als Doktorand am Institut für Klinische Physiologie im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin.

Die ärztliche Prüfung habe ich im August 1975 bestanden.

Meine Medizinalassistentenzeit beginnt am 1. November 1975 in Rotenburg / F.

Verordnung

über die Ausführung der Bestimmungen des Gesetzes über die
Einrichtung und den Betrieb von Schulen für die
Berufshilfen in Berlin.

Die Schulen für die Berufshilfen sind in der Regel
an den öffentlichen Schulen zu errichten und zu betreiben.
Die Schulen für die Berufshilfen sind in der Regel
an den öffentlichen Schulen zu errichten und zu betreiben.

Die Schulen für die Berufshilfen sind in der Regel
an den öffentlichen Schulen zu errichten und zu betreiben.
Die Schulen für die Berufshilfen sind in der Regel
an den öffentlichen Schulen zu errichten und zu betreiben.
Die Schulen für die Berufshilfen sind in der Regel
an den öffentlichen Schulen zu errichten und zu betreiben.

Die Schulen für die Berufshilfen sind in der Regel
an den öffentlichen Schulen zu errichten und zu betreiben.

Die Schulen für die Berufshilfen sind in der Regel
an den öffentlichen Schulen zu errichten und zu betreiben.

